

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2001年10月4日 (04.10.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/72321 A1

(51) 国際特許分類: A61K 38/00, A61P 29/00, 19/00, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/02737

(22) 国際出願日: 2001年3月30日 (30.03.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2000-098309 2000年3月31日 (31.03.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人聖マリアンナ医科大学 (ST. MARIANNA UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE) [JP/JP]; 〒216-8511 神奈川県川崎市宮前区青生2丁目16番1号 Kanagawa (JP). 参天製薬株式会社 (SANTEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒533-8651 大阪府大阪市東淀川区下新庄3丁目9番19号 Osaka (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中島利博 (NAKAJIMA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒305-0031 茨城県つくば市香妻2丁目10-1(816-103) Ibaraki (JP). 吉野慎一 (YOSHINO, Shinichi) [JP/JP]; 〒179-0071 東京都練馬区旭町2丁目35-4 Tokyo (JP). 西岡久寿樹 (NISHIOKA, Kuzuki) [JP/JP]; 〒150-0012 東京都渋谷区広尾4丁目1-5-802 Tokyo (JP). 笹野 稔 (SASANO,

Minoru) [JP/JP]. 青野浩之 (AONO, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒533-8651 大阪府大阪市東淀川区下新庄3丁目9番19号 参天製薬株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 安富康男, 外 (YASUTOMI, Yarusu et al.); 〒532-0011 大阪府大阪市淀川区西中島5丁目4番20号 中央ビル Osaka (JP).

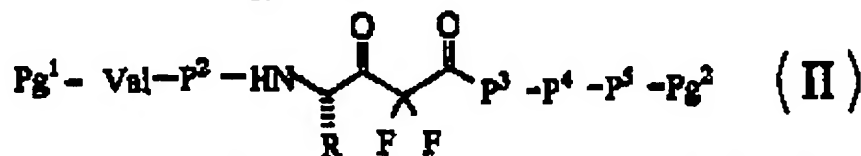
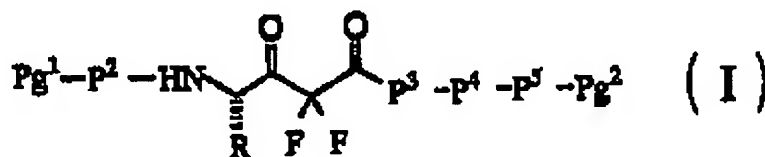
(81) 指定国 (国内): AR, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title:  $\gamma$ -SECRETASE-LIKE PROTEASE INHIBITORS(54) 発明の名称:  $\gamma$ -セクレターゼ様プロテアーゼの阻害剤(57) Abstract: Inhibitors for a  $\gamma$ -secretase-like protease acting on Notch of artrosynovial cells as its substrate; remedies for rheumatoid arthritis containing the same as the active ingredient; and a method of inhibiting the proliferation of artrosynovial cells. The inhibitors for a  $\gamma$ -secretase-like protease acting on Notch of artrosynovial cells as its substrate contain as the active ingredient compounds represented by the following general formulae (I) and (II) wherein P<sup>2</sup> represents L-isoleucine, D-valine or L-valtine; P<sup>3</sup> represents L-valine or L-phenylalanine; P<sup>4</sup> represents L-isoleucine; P<sup>5</sup> represents a direct bond, L-valine or L-phenylalanine; R represents methyl or isopropyl; and Pg<sup>1</sup> and Pg<sup>2</sup> represent each a protective group.

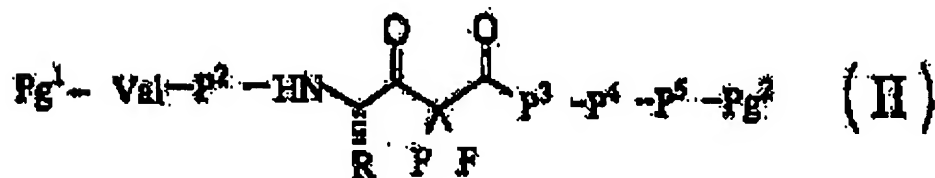
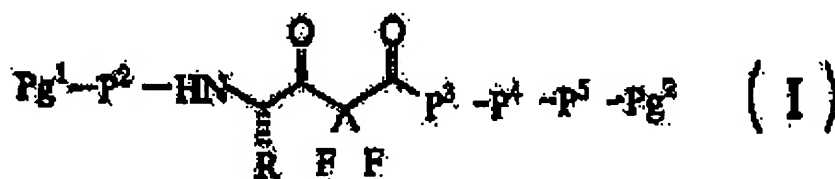
(続葉有)

WO 01/72321 A1



(37) 要約:

本発明は、関節滑膜細胞の Notch を基質とする γ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害剤及びこれを有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤並びに関節滑膜細胞増殖抑制方法を提供する。一般式 (I) 及び一般式 (II) で表される化合物を活性成分とする関節滑膜細胞の Notch を基質とする γ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害剤である。



一般式 (I) 及び一般式 (II) 中、 $\text{P}^2$  は、L-イソロイシン残基、D-バリン残基又は L-バリン残基を、 $\text{P}^3$  は、L-バリン残基又は L-フェニルアラニン残基を、 $\text{P}^4$  は、L-イソロイシン残基を、 $\text{P}^5$  は、直接結合、L-バリン残基又は L-フェニルアラニン残基を、それぞれ表す。R は、メチル基又はイソプロピル基を表す。 $\text{Pg}^1$  及び  $\text{Pg}^2$  は、それぞれ保護基を表す。

## 明細書

## γ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害剤

## 技術分野

- 5 本発明は、一般式（I）及び一般式（II）で表される化合物を活性成分とする、Notch、特に関節滑膜細胞のNotchを基質とするγ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害剤及び関節滑膜細胞のNotch不活性化剤に関する。上記阻害剤及び不活性化剤は慢性関節リウマチの治療に適用が期待される。本発明はまた、一般式（I）及び一般式（II）で表される化合物を有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤、及び、上記化合物を使用する滑膜細胞増殖抑制方法に関する。
- 10

## 背景技術

- 慢性関節リウマチは、多発性関節炎を主症状とする目下のところ原因が特定されていない慢性炎症性疾患である。慢性関節リウマチでは滑膜の炎症性浸潤、滑膜細胞の増殖、重層化と血管新生を伴い、病態が進行していく。特に、滑膜細胞の異常増殖、活性化は、リウマチの主病変の一つと考えられており（Harris et al., 1990, N. Eng. J. Med. 322, 1277-1289）、リウマチ患者の関節を調べると、滑膜絨毛の増殖や滑膜組織細胞の多層化等が認められ、滑膜細胞が異常増殖していることが判る。しかしながら、慢性関節リウマチの病態形成に重要な役割を果たす滑膜細胞のこのような機能過剰の原因は未だ充分解明されているとはいえず、滑膜細胞の異常増殖を抑制することが慢性関節リウマチの治療において極めて重要であることは論を待たない。
- 15
- 20

- 近年、滑膜細胞の活性化は様々なアプローチで検討されているが、その活性化メカニズムはいまだ不明な点が多い。細胞の運命は増殖、分化、細胞死に至る過程として制御されている。しかし、関節を形成している分化後の滑膜細胞がなぜ再び増殖、活性化されるのかは依然疑問のままである。自己反応性T細胞による相互作用やサイトカイン刺激のみでは充分に説明できない点が多いのである。むしろ、滑膜細胞自身のホメオスタシスに異常を来している可能性があると考えら
- 25

れる。

一方、アルツハイマー病の病態進行に密接に関連すると考えられているアミロイドタンパクを前駆体から切り出す酵素の一つとして $\gamma$ -セクレターゼが知られている。 $\gamma$ -セクレターゼは、膜貫通タンパクである $\beta$ -アミロイド前駆体タンパク (APP) の膜内ドメインを含むC末側フラグメント (CTF) を基質とし、アミロイド $\beta$ タンパク ( $A\beta$ ) を切り出すと考えられている。 $\gamma$ -セクレターゼ自体は未だ精製されておらず、プレゼニリン-1が $\gamma$ -セクレターゼかそのコファクターである可能性が指摘されているものの (Nature, Vol. 398, 8 April, 1999, 518~517; Biochemistry, Vol. 38, No. 15, 1999, 4720~4727)、基質の詳細、反応機構、結合の詳細等については未だ未解明である。

最近、この $\gamma$ -セクレターゼの阻害剤として知られているある種のジフルオロケトン含有ペプチドアナログ (J. Med. Chem., 1998, 41, 6~9) が、Notchのプロセッシングにも阻害剤として作用することが明らかになった (Nature, Vol. 398, 8 April, 1999, 518~522)。

細胞の増殖、分化に重要な役割を担っていることが明らかにされつつあるNotch遺伝子は、近年その構造や機能が明らかにされつつある。それによれば、Notch遺伝子がコードするタンパクNotchは細胞膜を貫通するレセプターであり、Notchレセプターに対するリガンド、リガンド結合性の制御因子等により活性化され、膜貫通ドメイン (TM) の近傍又は内部、おそらくはTMのC末端側において、ある種のプロテアーゼによりプロセッシングを受けて細胞内ドメイン (NICD) が遊離し、核内に移行すると考えられている (例えば、Nature, Vol. 398, 8 April, 1999, 518~522)。

そして、核内に移行した細胞内ドメインが標的遺伝子の転写活性化に寄与することにより、細胞外から細胞核への情報伝達が行われるものと考えられている (例えば、実験医学 Vol. 18, No. 1, 2000, 42-49)。

このNotchプロセッシングに働くプロテアーゼは、プレゼニリン-1の存在に依存することが知られており、上述の阻害剤の働きをも考慮してプレゼニリ

ン-1ディペンデントγ-セクレターゼ様プロテアーゼであると考えられる (Nature, Vol. 398, 8 April, 1999, 518~522)。

### 発明の要約

- 5      ところで、Notch遺伝子は、ヒトにおいては、従来、神経系、リンパ球系細胞等の細胞についてその発現が認められている。これに対して、滑膜細胞におけるNotch遺伝子の発現とその活性化が本発明者らによって新たに見いだされた。従って、滑膜細胞におけるこのNotch存在の新規知見に基づいて、関節滑膜細胞のNotch活性化を調節することによる慢性関節リウマチにおける
- 10   滑膜細胞のホメオスタシス制御の可能性が検討課題となった。

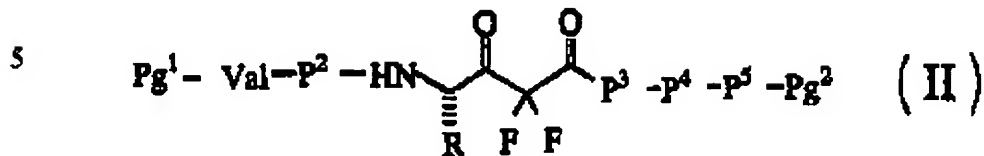
本発明は、上述の現状に鑑みて、Notch、特に関節滑膜細胞のNotch、を基質とするγ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害剤、関節滑膜細胞のNotch不活性化剤及びこれを利用した慢性関節リウマチ治療剤並びに関節滑膜細胞増殖抑制方法を提供することを目的とするものである。

- 15   本発明者らは、滑膜細胞においてNotchが存在するとの新規知見に基づいて滑膜細胞の増殖抑制につながる比較的低分子量の化合物を鋭意探索した結果、従来APPを基質とするプロテアーゼとして知られていたγ-セクレターゼの阻害剤であるジフルオロケトン含有ペプチドアナログが、滑膜細胞の増殖に対して有意の抑制効果を発揮することを見だし本発明を完成した。すなわち、本発明
- 20   は、下記一般式(I)で表される化合物を活性成分とする、Notchを基質とするγ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害剤である。



本発明はまた、上記一般式(I)で表される化合物及び下記一般式(II)で表される化合物からなる群から選択される少なくとも1種を活性成分とする、関

節滑膜細胞のN o t c hを基質とするγ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害剤である。



上記一般式 (I) 及び (II) 中、 $\text{P}^2$  は、L-イソロイシン残基、D-バリン残基又はL-バリン残基を、 $\text{P}^3$  は、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、 $\text{P}^4$  は、L-イソロイシン残基を、 $\text{P}^5$  は、直接結合、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、それぞれ表す。Rは、メチル基又はイソプロピル基を表す。 $\text{Pg}^1$  及び  $\text{Pg}^2$  は、それぞれ保護基を表す。

本発明はまた、上記一般式 (I) で表される化合物及び上記一般式 (II) で表される化合物からなる群から選択される少なくとも1種を活性成分とする関節滑膜細胞のN o t c h不活性化剤でもある。

本発明はまた、上記一般式 (I) で表される化合物及び上記一般式 (II) で表される化合物からなる群から選択される少なくとも1種を有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤でもある。

20 本発明は更に、上記一般式 (I) で表される化合物及び上記一般式 (II) で表される化合物からなる群から選択される少なくとも1種を関節滑膜細胞に適用する関節滑膜細胞増殖抑制方法でもある。

本発明における好ましい態様においては、上記化合物は、一般式 (II) における  $\text{P}^2$  がL-イソロイシン残基、 $\text{P}^3$  がL-バリン残基、 $\text{P}^4$  がL-イソロイシン残基、 $\text{P}^5$  が直接結合、Rがメチル基、 $\text{Pg}^1$  がt-ブトキシカルボニル基、 $\text{Pg}^2$  がメトキシ基である化合物である。

#### 図面の簡単な説明

図1は、ヒト関節滑膜組織におけるN o t c hの存在を示す顕微鏡写真図であ

る。

図2は、実施例2における化合物(1)による滑膜細胞増殖抑制試験の結果を示すグラフである。

## 5 発明の詳細な開示

以下に本発明を詳述する。

本発明は、Notchを基質とするγ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害剤であって、上記一般式(I)で表される化合物を活性成分とするものである。また、上記一般式(I)で表される化合物及び上記一般式(II)で表される化合物からなる群から選択される少なくとも1種は、関節滑膜細胞のNotchを基質とするγ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害剤の活性成分である。

Notch遺伝子がコードするタンパクNotchは、幾つかの特徴的なドメインを有しており、まず、N末端に疎水的シグナル配列、続いて、細胞外ドメインを構成するEGF(epidermal growth factor)様繰り返し配列(10~36繰り返し)及び3つのLin-12/Notch繰り返し配列(LNR)を有する。次に、膜貫通ドメイン(TM)を隔てて細胞内ドメイン(NICD)を構成する6つのcdc10/SW16繰り返し配列を有し、更に、opa繰り返し配列及びPEST配列をC末端近傍に有する。これらの特徴的ドメインは、Notchホモログ間で知られている限り共通に見られる(例えば、特表平7-509123号公報図25)。

Notch遺伝子はショウジョウバエから脊椎動物まで広く発現が認められているのであるが、従来、その機能については不明の点が少なくなかった。最近の研究によれば、Notchの細胞内ドメイン(NICD)がプロテアーゼの働きにより遊離して核内に移行し、遺伝子の転写に影響を及ぼす可能性が明らかになってきた。すなわち、ショウジョウバエでは、ヘアレスサプレッサー(Suppressor of Hairless(Su(H)))とDeltexとがNotchの細胞内ドメイン(NICD)と直接結合することが知られているが、更に、哺乳類のSu(H)ホモログであるCBF1/RBPJκと結合して作用を発現することも明らかになった(Hsiehら、Mol. Cell. Biol.

16, 952-959 (1996))。Hsiehらによれば、NICDがCBF1の転写抑制ドメインに結合し、Epstein-BarrウイルスEBNA2と同様のメカニズムで細胞の不死化に係わっていることが示唆された(Hsiehら、上掲)。

- 5 ヒトNotchのNICDには、NICD1(1751-1864アミノ酸残基)及びNICD2(1865-1976アミノ酸残基)の二つのドメインが存在する。ただし、アミノ酸残基番号は、ヒトNotch遺伝子のcDNA(7332bp、コドンスタート=1)に基づいて求められたアミノ酸配列に基づく。これらNICD1及びNICD2については、Mammalian two h  
10 ybrid法により、NICD1がRBPJ $\kappa$ との結合活性を有し、NICD2のほうは結合活性を有さないことがHsiehらにより報告されている(Hsiehら、上掲)。

- 一方、RBPJ $\kappa$ は、TNF- $\alpha$ 等のプロモーター領域に存在してサイトカイン等の発現調節を行っているNF- $\kappa$ B2の抑制因子であることから、NICD  
15 がRBPJ $\kappa$ と結合して抑制ドメインと結合することによりNF- $\kappa$ B2を活性化することがOswaldらによって報告されている(Mol. Cell. Biol. 18, 2077-2088 (1998))。

- これらの知見は、Notchの細胞増殖における関与を強く示唆するものであると言える。しかしながら、Notchと慢性関節リウマチとの関係を示唆する  
20 報文は未だ存在しない。

このNotch遺伝子の発現とその活性化が、後に詳細に説明するように、本発明者らによって滑膜細胞においても見られることが発見されたことから、滑膜細胞のNotchの活性化を抑制する可能性、及び、滑膜細胞における異常増殖、分化の抑制の可能性が現実のものとなった。

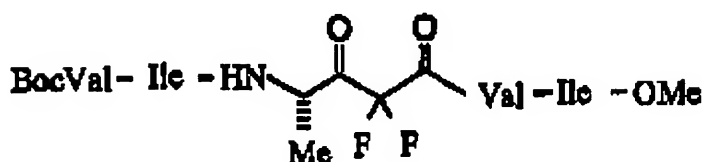
- 25 すなわち、本発明においては、Notchを基質とするγ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害剤として、上記一般式(I)で表される化合物を活性成分に用いる。また、関節滑膜細胞のNotchを基質とするγ-セクレターゼ様プロテアーゼに対する阻害剤として上記一般式(I)で表される化合物及び上記一般式(II)で表される化合物からなる群から選択される少なくとも1種を活性成分



に用いる。上記一般式 (I) 及び一般式 (I I) 中、 $P^2$  は、L-イソロイシン残基、D-バリン残基又はL-バリン残基を、 $P^3$  は、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、 $P^4$  は、L-イソロイシン残基を、 $P^5$  は、直接結合、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、それぞれ表す。Rは、メチル基又はイソプロピル基を表す。 $Pg^1$  及び  $Pg^2$  は、それぞれ保護基を表す。上記保護基は、それぞれN末保護基、C末保護基であり、周知の保護基、例えば、ベンジルオキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基、メトキシ基、エトキシ基、2級アミノ基等であつてよい。

上記化合物としては、例えば、以下に示す化合物を挙げることができる。

- (1) 一般式 (I I) において、 $P^2$  はL-イソロイシン残基、 $P^3$  はL-バリン残基、 $P^4$  はL-イソロイシン残基、 $P^5$  は直接結合、Rはメチル基、 $Pg^1$  はt-ブトキシカルボニル基、 $Pg^2$  はメトキシ基である下記化学式の化合物 (以下、「化合物 (1)」ともいう)。



- (2) 一般式 (I) において、 $P^2$  はL-イソロイシン残基、 $P^3$  はL-バリン残基、 $P^4$  はL-イソロイシン残基、 $P^5$  は直接結合、L-バリン残基、L-フェニルアラニン残基又はL-イソロイシン残基、Rはメチル基、 $Pg^1$  はt-ブトキシカルボニル基、 $Pg^2$  はメトキシ基である化合物；例えば、 $P^2$  はL-イソロイシン残基、 $P^3$  はL-バリン残基、 $P^4$  はL-イソロイシン残基、 $P^5$  は直接結合、Rはメチル基である化合物 (化合物 (2)) ； $P^2$  はL-イソロイシン残基、 $P^3$  はL-バリン残基、 $P^4$  はL-イソロイシン残基、 $P^5$  はL-バリン残基、Rはメチル基である化合物 (化合物 (3)) ； $P^2$  はL-イソロイシン残基、 $P^3$  はL-バリン残基、 $P^4$  はL-イソロイシン残基、 $P^5$  はL-フェニルアラニン残基、Rはメチル基である化合物 (化合物 (4))

;  $P^2$  はL-イソロイシン残基、 $P^3$  はL-バリン残基、 $P^4$  はL-イソロイシン残基、 $P^5$  はL-イソロイシン残基、Rはメチル基である化合物（化合物（5））等。

- （3）一般式（I）において、 $P^2$  はL-バリン残基又はD-バリン残基、 $P^3$  はL-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基、 $P^4$  はL-イソロイシン残基を、 $P^5$  は直接結合、Rはメチル基又はイソプロピル基、 $Pg^1$  はt-ブトキシカルボニル基、 $Pg^2$  はメトキシ基である化合物：例えば、 $P^2$  はL-バリン残基、 $P^3$  はL-バリン残基、 $P^4$  はL-イソロイシン残基を、 $P^5$  は直接結合、Rはメチル基である化合物（化合物（6））； $P^2$  はD-バリン残基、 $P^3$  はL-バリン残基、 $P^4$  はL-イソロイシン残基を、 $P^5$  は直接結合、Rはメチル基である化合物（化合物（7））； $P^2$  はL-バリン残基、 $P^3$  はL-フェニルアラニン残基、 $P^4$  はL-イソロイシン残基を、 $P^5$  は直接結合、Rはメチル基である化合物（化合物（8））； $P^2$  はD-バリン残基、 $P^3$  はL-フェニルアラニン残基、 $P^4$  はL-イソロイシン残基を、 $P^5$  は直接結合、Rはメチル基である化合物（化合物（9））； $P^2$  はL-バリン残基、 $P^3$  はL-バリン残基、 $P^4$  はL-イソロイシン残基を、 $P^5$  は直接結合、Rはイソプロピル基である化合物（化合物（10））等。

- 上記化合物の製造方法としては、例えば、化合物（1）を例にとって説明するならば、J. Med. Chem., 1998, 41, 6-9記載の方法に準じて、（S）-2-アミノ-1-プロパノールをt-ブトキシカーバメートで保護し酸化して対応するアルデヒドに変換し、還流下にエチルプロモジフルオロアセテートとレフォルマトスキー反応せしめてジフルオロアルコールにし、水酸化物存在下に加水分解する。次に、ジイソプロピルカルボジイミド（DIPC）及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール（HOBT）を使用して $H_2N-Va1-I1e-OMe$ と結合し、得られたペプチドアナログを再結晶化して単離したものに、トリフルオロ酢酸を作用させてN脱保護し、 $BocHN-Va1-I1e-OH$ を結合してアルコール対応物とし、これをデスーマーチン酸化することにより目的の化合物を得ることができる。この方法に準じて、付加するペプチドを適宜変更することにより、各種のペプチドアナログを合成することが可能である。

- Notchレセプターに対するリガンド刺激によるNotch活性化に伴って生じるNotchプロセッシングは、プレゼニリン-1ディペンデントγ-セクレターゼ様プロテアーゼによるものであると考えられている。目下のところ、このプロテアーゼが直接Notchに作用するのか又はコファクターを介して作用
- 5 するのは必ずしも明らかではないが、このプロテアーゼの基質となるNotchの部位にアナログな構造を有する化合物は阻害活性を有する可能性が高いと考えられる。Notch細胞内移行タンパク (Notch細胞内ドメイン) が切り出されるNotchの部位は、膜貫通ドメイン (TM) と呼ばれる疎水性領域 (DrosophilaのNotchではアミノ酸1746~1765) 又はそ
- 10 の近傍であると考えられている。また、APPのγ-セクレターゼ切断部位と想定されているVal713とThr714を含む近傍のアミノ酸配列を有するペプチドアナログも阻害活性を有することができる。従って、プレゼニリン-1ディペンデントγ-セクレターゼ様プロテアーゼの基質特異性は高くないと考えられる。
- 15 上記化合物を用いることにより、滑膜細胞の増殖を抑制することができる。また、上記化合物を用いることにより、滑膜細胞のNotchが、レセプターに対するリガンド刺激によりシグナルを細胞内に伝達するという、滑膜細胞におけるNotchの作用を抑止することができ、従って、Notch不活性化を果たすことができる。
- 20 本発明の、Notchを基質とするγ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害剤、滑膜細胞のNotchを基質とするγ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害剤、関節滑膜細胞のNotch不活性化剤及び慢性関節リウマチ治療剤は、上記化合物を活性成分又は有効成分としてなる。上記不活性化剤及び治療剤には、安定剤等の周知のその他の成分を、本発明の目的を阻害しない範囲で使用することができる。また、上記阻害剤、不活性化剤及び治療剤には薬理学的に許容される担体を配合することができる。更に、所望の組織を標的に上記活性成分、有効成分を
- 25 輸送するための手段や、標的細胞への移行導入を容易にするための手段、例えば、薬理学的に許容されるカチオン性脂質等によるリボソームの利用等を含んでいてもよい。

- 活性成分又は有効成分である上記化合物の投与は、経口でも、非経口でも可能である。投与剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、注射剤等が挙げられ、汎用されている技術を用いて製剤化することができる。例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤等の経口剤であれば、乳糖、結晶セルロース、デンプン等の増量剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ヒドロキシプロピルセルロースポリビニルピロリドン等の結合剤、カルボキシメチルセルロース カルシウム、低置換ヒドロキシプロピルメチルセルロース等の崩壊剤、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、マクロゴール、シリコン樹脂等のコーティング剤などを必要に応じて加えればよい。
- 10 上記化合物の投与量は、症状、年齢、剤型等によって適宜選択できるが、経口剤であれば通常1日当り0.01～6000mg、好ましくは1～600mgを1回または数回に分けて投与すればよい。

#### 発明を実施するための最良の形態

- 15 以下に実験例、実施例及び製剤例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、これらは専ら本発明の理解に資するためのものであり、本発明はこれらのみに限定されるものではない。

#### 実験例1 慢性関節リウマチ滑膜細胞におけるNotchの活性化

- 20 慢性関節リウマチ（RA）滑膜組織におけるNotchの発現を免疫染色方法で検出した。使用した滑膜組織は、慢性関節リウマチ患者の膝関節手術時に同意のもとに得られた滑膜組織の凍結切片である。使用した一次抗体は、Santa Cruz社（CA, USA）製ヤギ抗Notch-1ポリクローナル抗体である。これはNotchのC末ペプチドに対する抗体であり、Notch-2、Notch-3又はNotch-4に対する結合性はなく、ヒトのNotch-1と結合する。ビオチン化抗ヤギ抗体（DAKO社（CA, USA）製）を二次抗体として用い、免疫染色の検出は、DAKO社製CSAシステムを用い、さらに対比染色としてメチルグリーンにより核を染色した。なお、比較実験として変形性関節症（OA）滑膜組織を使用した。結果を図1に示した。図1中、RAはRA滑
- 25

膜組織における抗Notch-1抗体による免疫染色の結果を表す。OAはOA滑膜組織における抗Notch-1抗体による免疫染色の結果を表す。A、Bとも×1000である。

図1の結果、RA滑膜組織においては、細胞質及び細胞核内の双方においてNotchの発現が認められた(図1RA)。一方、OA滑膜組織においては細胞の周囲にNotchの発現が認められた(図1OA)。この結果、滑膜細胞においてNotchが発現しており、しかも、RA滑膜細胞においては、OA滑膜細胞に比べて特徴的なことに核内に移行していることが明らかとなった。なお、免疫蛍光染色も試みたが、その結果、RA滑膜細胞においては、Notchの約80～50%が核内に存在していたが、OA滑膜細胞においては細胞質にのみ存在が確認された。

また、Notch-1のmRNAがRA滑膜細胞においてもOA滑膜細胞においても存在していることをノーザンブロット分析により確かめた。

## 15 実施例1 化合物(1)によるNotchの滑膜細胞核内移行抑止試験

### (1) 滑膜細胞の調製

滑膜細胞としては、OA患者の膝関節手術時に同意のもとに得られた滑膜組織から採取したものをを用いた。得られた滑膜組織を細かくしPBSで3回洗浄し、1mg/mlのコラゲナーゼ(Sigma, St. Louis, MO)で30分間37℃で処理し、細胞サスペンションを得、10分間500×gで遠心して集め、10%FCS(GIBCO BRL社製)を含むDMEMに懸濁した。こうして得た細胞懸濁液を培養器で3～5代継代培養したものを使用した。

### (2) TNF- $\alpha$ 処理

それぞれ0、10、50ng/mlのTNF- $\alpha$ (GIBCO BRL社製)でOA滑膜細胞を3時間処理した後、蛍光免疫法染色法によりNotch-1を検出した。その結果、TNF- $\alpha$ 未処理の滑膜細胞は殆ど核内にNotch-1を検出しなかったが、TNF- $\alpha$ 処理細胞は、核にNotch-1を検出し、しかも、TNF- $\alpha$ 処理濃度に比例してNotch-1の核内移行が認められた。なお、核染色はHoechst 33258(和光純薬工業社製)で行い、また、

蛍光分析は蛍光顕微鏡BX-60（オリンパス社製）で行った。

更に、TNF- $\alpha$ 処理細胞の核抽出物をSDS-PAGEにかけて抗Notch-1抗体を用いてウエスタンブロット分析にかけたところ、約60kDaのペプチドが検出された。TNF- $\alpha$ 未処理のRA滑膜細胞の核においても同様にウ  
5 エスタンブロット分析で約60kDaのペプチドが検出された。この結果、滑膜細胞においてはTNF- $\alpha$ 刺激によるNotch-1の核内移行が、従って、 $\gamma$ -セクレターゼ様プロテアーゼによるNotchのプロセッシングが確かめられた。

### （3）阻害試験

10 次に、化合物（1）を使用してTNF- $\alpha$ 処理したOA滑膜細胞を上記と同様にして蛍光免疫法染色分析した。化合物（1）はJ. Med. Chem., 1998, 41, 6-9記載の方法に準拠して合成した。すなわち、（S）-2-アミノ-1-プロパノールをt-ブトキシカーバメートで保護し酸化して対応アルデヒドに変換し、還流下にエチルプロモジフルオロアセテートとレフォルマトス  
15 キー反応せしめてジフルオロアルコールにし、水酸化物存在下に加水分解し、次に、DIPC及びHOBTを使用してH<sub>2</sub>N-Val-Ile-OMeと結合し、得られたペプチドアナログを再結晶化して単離したものに、トリフルオロ酢酸を作用してN脱保護し、BocHN-Val-Ile-OHを結合してアルコール対応物を得、これをデスーマーチン酸化して目的の化合物を得た。

20 10ng/mlのTNF- $\alpha$ 処理OA滑膜細胞においては検出された核内移行Notch-1が、10 $\mu$ Mの化合物（1）を加えた10ng/mlのTNF- $\alpha$ 処理OA滑膜細胞では殆ど検出されなかった。この結果、化合物（1）は、少なくとも10 $\mu$ MにてTNF- $\alpha$ 刺激によるNotch-1の活性化に伴うプレゼニリン-1ディペンデント $\gamma$ -セクレターゼ様プロテアーゼのNotchプロ  
25 セッシングを阻害すること、従って、Notch活性化を抑止することが確認された。

### 実施例2 化合物（1）による慢性関節リウマチ滑膜細胞増殖抑制試験

滑膜細胞としては、慢性関節リウマチ患者の膝関節手術時に同意のもとに得ら

れた滑膜組織から血球を排除した後、24穴培養プラスチックプレート（100マイクロリットル）で細胞数 $5 \times 10^4$ /wellの条件にて、RPMI 1640（日本免疫研究所社製）（ペニシリン、ストレプトマイシン含有、10% FCS）中で3～5代継代培養したものを使用した。

- 5 滑膜細胞を96穴プレートに $1 \times 10^4$ /wellとなるように播種し、10% FCS含有RPMI 1640培地で一晚培養した。培地をフレッシュな0.5% FCS含有RPMI 1640培地に交換し、24時間培養した。その後、培地をフレッシュな0.5% FCS含有RPMI 1640培地 $150 \mu\text{l}$ /wellに変更した。次に、それぞれ0.01、0.1、1、 $10 \mu\text{M}$ となるようにDM
- 10 SOに溶解した化合物（1）を添加した。ネガティブコントロール群とコントロール群には1% DMSO-0.5% FCS-RPMI 1640培地を添加した。また、ネガティブコントロール以外の群に $5 \text{ ng/ml}$ のTNF- $\alpha$ を添加し、ネガティブコントロールには0.5% FCS-RPMI 1640培地を添加した。更に、 $[^3\text{H}]$  デオキシウリジン（ $1 \mu\text{Ci/well}$ ）を添加し、48時間培
- 15 養した。培養後、細胞を集め、 $[^3\text{H}]$  デオキシウリジンの取り込みをTOP COUNT（Packard社製，CA，USA）で計測した。

結果を図2に示した。数値は、コントロールを100とした場合の相対値である。

- 実施例の結果から、本発明の阻害剤は、約 $10 \mu\text{M}$ 程度以下の量の活性成分で
- 20 もコントロールと比べて明らかに、TNF- $\alpha$ 誘導の滑膜細胞増殖を抑制しうること、及び、Notchの核内移行がTNF- $\alpha$ 誘導の滑膜細胞増殖と直接関連していること、等が明らかとなった。

#### 製剤例

- 25 以下に、本発明における活性成分、有効成分である上記化合物の経口剤および注射剤の一般的な製剤例を示す。

#### 1) 錠剤

処方1 100mg中

	化合物 (1)	1	mg
	乳糖	66.4	mg
	トウモロコシデンプン	20	mg
	カルボキシメチルセルロース カルシウム	6	mg
5	ヒドロキシプロピルセルロース	4	mg
	ステアリン酸 マグネシウム	0.6	mg

錠剤に、コーティング剤（例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、マクロゴール、シリコン樹脂等通常のコーティング剤）2 mgを用いてコーティングし、目的とする錠剤を得る（以下の処方錠剤も同じ）。

10

処方2 100 mg 中

	化合物 (1)	5	mg
	乳糖	62.4	mg
	トウモロコシデンプン	20	mg
15	カルボキシメチルセルロース カルシウム	6	mg
	ヒドロキシプロピルセルロース	4	mg
	ステアリン酸 マグネシウム	0.6	mg
	コーティング剤	2	mg

20 処方3 100 mg 中

	化合物 (1)	20	mg
	乳糖	51	mg
	トウモロコシデンプン	15	mg
	カルボキシメチルセルロース カルシウム	5	mg
25	ヒドロキシプロピルセルロース	5	mg
	ステアリン酸 マグネシウム	1	mg
	タルク	1	mg
	コーティング剤	2	mg



処方 4 100mg 中

	化合物 (1)	40mg
	乳糖	34mg
	トウモロコシデンプン	10mg
5	カルボキシメチルセルロース カルシウム	5mg
	ヒドロキシプロピルセルロース	5mg
	ステアリン酸 マグネシウム	2mg
	タルク	2mg
	コーティング剤	2mg

10

処方 5 220mg 中

	化合物 (1) 100mg	
	乳糖	67mg
	トウモロコシデンプン	20mg
15	カルボキシメチルセルロース カルシウム	10mg
	ヒドロキシプロピルセルロース	10mg
	ステアリン酸 マグネシウム	4mg
	タルク	4mg
	コーティング剤	5mg

20

2) カプセル剤処方 1 150mg 中

	化合物 (1)	5mg
	乳糖	145mg

- 25 化合物 (1) と乳糖の混合比を変えることにより、化合物 (1) の成分量が 10mg/カプセル、30mg/カプセル、50mg/カプセル、100mg/カプセルのカプセル剤も調製した。

3) 顆粒剤

処方 1 100mg 中

	化合物 (1)	30 mg
	マンニトール	46.5 mg
	ポリビニルピロリドン K-30	7 mg
5	オイドラギット RL	16 mg
	トリアセチン	1.5 mg

処方 2 130mg 中

	化合物 (1)	50 mg
10	乳糖	55 mg
	パレイシヨデンプン	20 mg
	ヒドロキシプロピルセルロース	4 mg
	タルク	微量

15 4) 注射剤処方 1 10ml 中

	化合物 (1)	10 ~ 100 mg
	塩化ナトリウム	90 mg
	水酸化ナトリウム	適量
20	滅菌精製水	適量

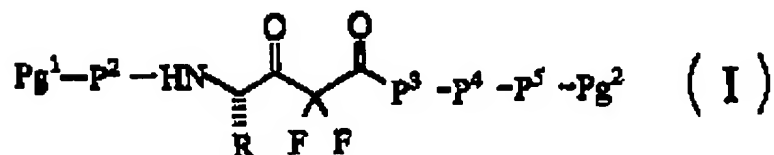
## 産業上の利用可能性

本発明においては、上述のように、上記一般式 (I) 又は (II) で表される化合物を使用することにより、滑膜細胞における Notch 活性化を抑制することができ、ホメオスタシスの異常を呈すると考えられる慢性関節リウマチ関節滑膜細胞の異常増殖、分化を抑制することができる。また、この化合物を活性成分、有効成分として、Notch、特に滑膜細胞の Notch、を基質とする γ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害剤、関節滑膜細胞の Notch 不活性化剤、慢性関節リウマチ治療剤及び関節滑膜細胞増殖抑制方法を提供することができる。

## 請求の範囲

1. 一般式 (I) で表される化合物を活性成分とすることを特徴とする、N o t c h を基質とする γ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害剤。

5

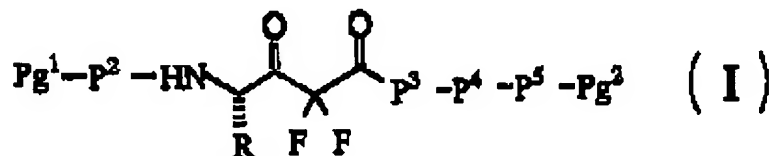


10 式中、 $\text{P}^2$ は、L-イソロイシン残基、D-バリン残基又はL-バリン残基を、 $\text{P}^3$ は、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、 $\text{P}^4$ は、L-イソロイシン残基を、 $\text{P}^5$ は、直接結合、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、それぞれ表す。Rは、メチル基又はイソプロピル基を表す。 $\text{Pg}^1$ 及び $\text{Pg}^2$ は、それぞれ保護基を表す。

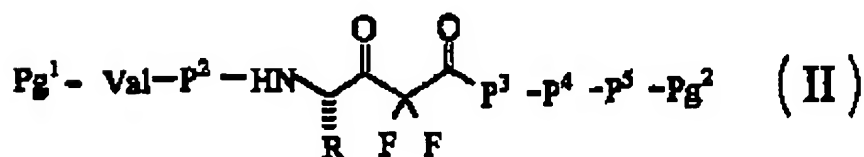
15

2. 一般式 (I) で表される化合物及び一般式 (II) で表される化合物からなる群から選択される少なくとも1種を活性成分とすることを特徴とする、関節滑膜細胞のN o t c h を基質とする γ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害剤。

20



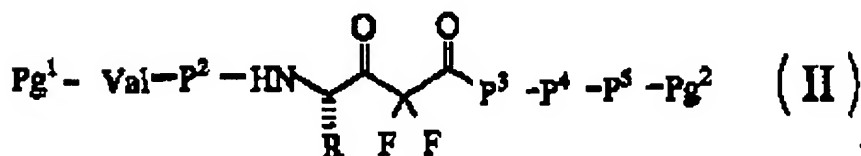
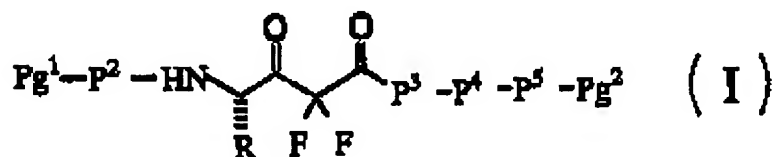
25



一般式 (I) 及び (II) 中、 $P^2$ は、L-イソロイシン残基、D-バリン残基又はL-バリン残基を、 $P^3$ は、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、 $P^4$ は、L-イソロイシン残基を、 $P^5$ は、直接結合、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、それぞれ表す。Rは、メチル基又はイソプロピル基を表す。 $Pg^1$ 及び $Pg^2$ は、それぞれ保護基を表す。

3. 一般式 (II) において、 $P^2$ はL-イソロイシン残基、 $P^3$ はL-バリン残基、 $P^4$ はL-イソロイシン残基、 $P^5$ は直接結合、Rはメチル基、 $Pg^1$ はt-ブトキシカルボニル基、 $Pg^2$ はメトキシ基である化合物を活性成分とする請求の範囲第2項記載の阻害剤。

4. 一般式 (I) で表される化合物及び一般式 (II) で表される化合物からなる群から選択される少なくとも1種を活性成分とすることを特徴とする、関節滑膜細胞のNotch不活性化剤。



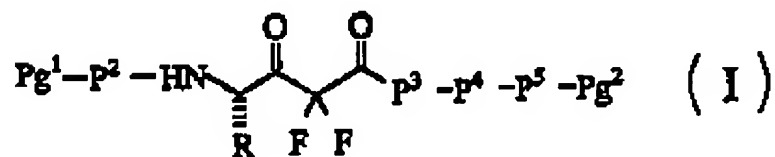
一般式 (I) 及び (II) 中、 $P^2$ は、L-イソロイシン残基、D-バリン残基又はL-バリン残基を、 $P^3$ は、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、 $P^4$ は、L-イソロイシン残基を、 $P^5$ は、直接結合、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、それぞれ表す。Rは、メチル基又はイソプロピル

基を表す。Pg<sup>1</sup>及びPg<sup>2</sup>は、それぞれ保護基を表す。

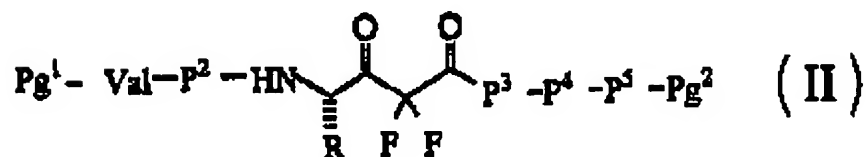
5. 一般式 (I I) において、P<sup>2</sup>はL-イソロイシン残基、P<sup>3</sup>はL-バリン残基、P<sup>4</sup>はL-イソロイシン残基、P<sup>5</sup>は直接結合、Rはメチル基、Pg<sup>1</sup>はt-ブトキシカルボニル基、Pg<sup>2</sup>はメトキシ基である化合物を活性成分とする請求の範囲第4項記載の不活性化剤。

6. 一般式 (I) で表される化合物及び一般式 (I I) で表される化合物からなる群から選択される少なくとも1種を有効成分とする慢性関節リウマチ治療剤。

10



15



20

一般式 (I) 及び (I I) 中、P<sup>2</sup>は、L-イソロイシン残基、D-バリン残基又はL-バリン残基を、P<sup>3</sup>は、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、P<sup>4</sup>は、L-イソロイシン残基を、P<sup>5</sup>は、直接結合、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、それぞれ表す。Rは、メチル基又はイソプロピル基を表す。Pg<sup>1</sup>及びPg<sup>2</sup>は、それぞれ保護基を表す。

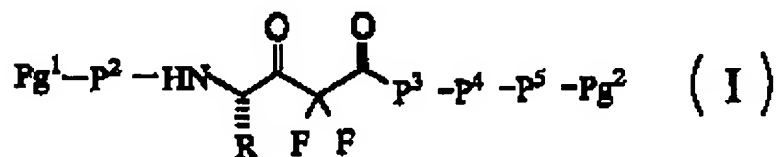
25

7. 一般式 (I I) において、P<sup>2</sup>はL-イソロイシン残基、P<sup>3</sup>はL-バリン残基、P<sup>4</sup>はL-イソロイシン残基、P<sup>5</sup>は直接結合、Rはメチル基、Pg<sup>1</sup>はt-ブトキシカルボニル基、Pg<sup>2</sup>はメトキシ基である化合物を有効成分とする請

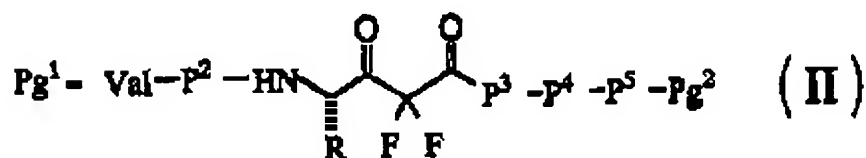
求の範囲第 8 項記載の治療剤。

8. 一般式 (I) で表される化合物及び一般式 (II) で表される化合物からなる群から選択される少なくとも 1 種を関節滑膜細胞に適用することを特徴とする

5 関節滑膜細胞増殖抑制方法。



10



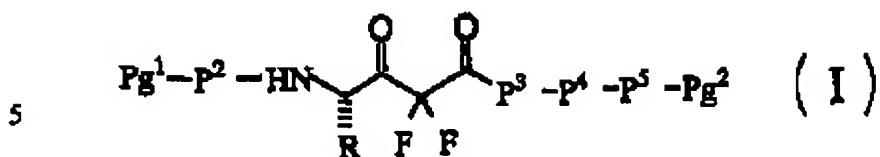
15

一般式 (I) 及び (II) 中、 $\text{P}^2$  は、L-イソロイシン残基、D-バリン残基又は L-バリン残基を、 $\text{P}^3$  は、L-バリン残基又は L-フェニルアラニン残基を、 $\text{P}^4$  は、L-イソロイシン残基を、 $\text{P}^5$  は、直接結合、L-バリン残基又は  
20 L-フェニルアラニン残基を、それぞれ表す。R は、メチル基又はイソプロピル基を表す。 $\text{Pg}^1$  及び  $\text{Pg}^2$  は、それぞれ保護基を表す。

9. 一般式 (II) において、 $\text{P}^2$  は L-イソロイシン残基、 $\text{P}^3$  は L-バリン残基、 $\text{P}^4$  は L-イソロイシン残基、 $\text{P}^5$  は直接結合、R はメチル基、 $\text{Pg}^1$  は t-  
25 ーブトキシカルボニル基、 $\text{Pg}^2$  はメトキシ基である化合物を使用する請求の範囲第 8 項記載の方法。

10. 有効量の一般式 (I) で表される化合物を活性成分として投与することを特徴とする、Notch を基質とする γ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害方

法。

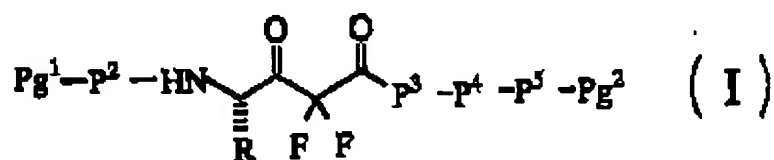


式中、 $\text{P}^2$ は、L-イソロイシン残基、D-バリン残基又はL-バリン残基を、 $\text{P}^3$ は、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、 $\text{P}^4$ は、L-イソロイシン残基を、 $\text{P}^5$ は、直接結合、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、それぞれ表す。Rは、メチル基又はイソプロピル基を表す。 $\text{Pg}^1$ 及び $\text{Pg}^2$ は、それぞれ保護基を表す。

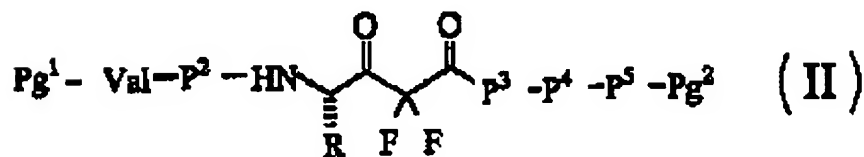
10

11. 有効量の一般式(I)で表される化合物及び一般式(II)で表される化合物からなる群から選択される少なくとも1種を活性成分として投与することを特徴とする、関節滑膜細胞のN o t c hを基質とするγ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害方法。

15



20



25 一般式(I)及び(II)中、 $\text{P}^2$ は、L-イソロイシン残基、D-バリン残基

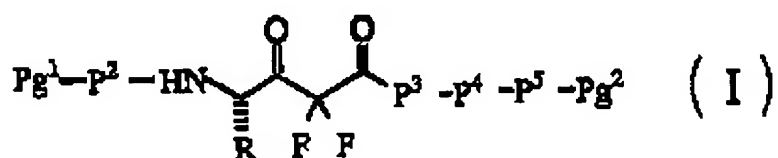
又はL-バリン残基を、 $P^3$ は、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、 $P^4$ は、L-イソロイシン残基を、 $P^5$ は、直接結合、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、それぞれ表す。Rは、メチル基又はイソプロピル基を表す。 $Pg^1$ 及び $Pg^2$ は、それぞれ保護基を表す。

5

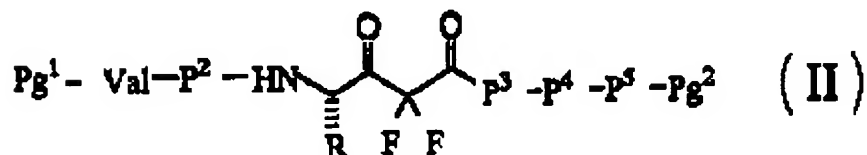
12. 一般式 (I I) において、 $P^2$ はL-イソロイシン残基、 $P^3$ はL-バリン残基、 $P^4$ はL-イソロイシン残基、 $P^5$ は直接結合、Rはメチル基、 $Pg^1$ はt-ブトキシカルボニル基、 $Pg^2$ はメトキシ基である化合物を活性成分とする請求の範囲第11項記載の阻害方法。

10

13. 有効量的一般式 (I) で表される化合物及び一般式 (I I) で表される化合物からなる群から選択される少なくとも1種を活性成分として投与することを特徴とする、関節滑膜細胞のNotch不活性化方法。



15



20

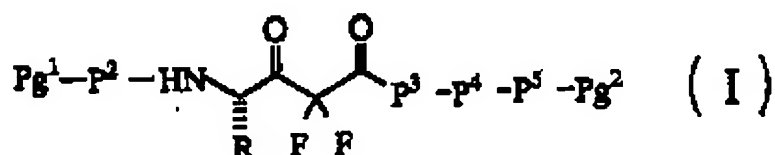
一般式 (I) 及び (I I) 中、 $P^2$ は、L-イソロイシン残基、D-バリン残基又はL-バリン残基を、 $P^3$ は、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、 $P^4$ は、L-イソロイシン残基を、 $P^5$ は、直接結合、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、それぞれ表す。Rは、メチル基又はイソプロピル基を表す。 $Pg^1$ 及び $Pg^2$ は、それぞれ保護基を表す。

25

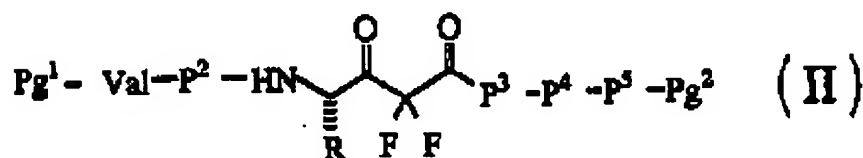


14. 一般式 (I I) において、 $P^2$ はL-イソロイシン残基、 $P^3$ はL-バリン残基、 $P^4$ はL-イソロイシン残基、 $P^5$ は直接結合、 $R$ はメチル基、 $Pg^1$ は  
 t-ブトキシカルボニル基、 $Pg^2$ はメトキシ基である化合物を活性成分とする  
 5 請求の範囲第13項記載の不活性化方法。

15. 有効量の一般式 (I) で表される化合物及び一般式 (I I) で表される化合物からなる群から選択される少なくとも1種を有効成分として投与することを特徴とする慢性関節リウマチの治療方法。



10



15

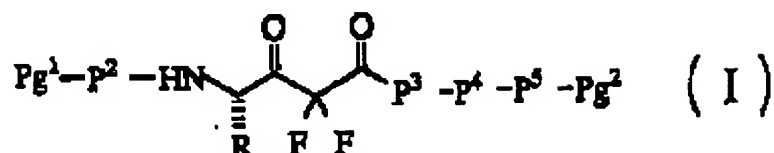
一般式 (I) 及び (I I) 中、 $P^2$ は、L-イソロイシン残基、D-バリン残基又はL-バリン残基を、 $P^3$ は、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、 $P^4$ は、L-イソロイシン残基を、 $P^5$ は、直接結合、L-バリン残基又は  
 20 L-フェニルアラニン残基を、それぞれ表す。 $R$ は、メチル基又はイソプロピル基を表す。 $Pg^1$ 及び $Pg^2$ は、それぞれ保護基を表す。

I 6. 一般式 (I I) において、 $P^2$ はL-イソロイシン残基、 $P^3$ はL-バリン残基、 $P^4$ はL-イソロイシン残基、 $P^5$ は直接結合、 $R$ はメチル基、 $Pg^1$ は  
 25 t-ブトキシカルボニル基、 $Pg^2$ はメトキシ基である化合物を有効成分とする

請求の範囲第15項記載の治療方法。

17. Notchを基質とするγ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害のための、一般式(I)で表される化合物の使用。

5

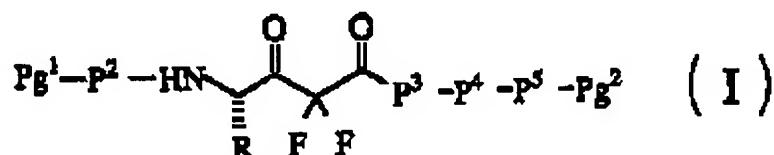


- 10 式中、 $\text{P}^2$ は、L-イソロイシン残基、D-バリン残基又はL-バリン残基を、 $\text{P}^3$ は、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、 $\text{P}^4$ は、L-イソロイシン残基を、 $\text{P}^5$ は、直接結合、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、それぞれ表す。Rは、メチル基又はイソプロピル基を表す。 $\text{Pg}^1$ 及び $\text{Pg}^2$ は、それぞれ保護基を表す。

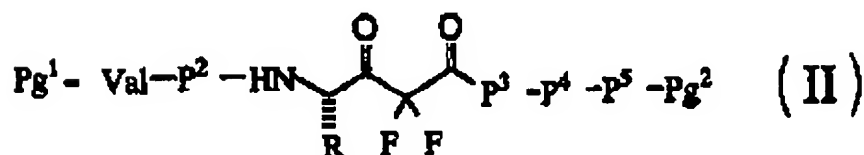
15

18. 関節滑膜細胞のNotchを基質とするγ-セクレターゼ様プロテアーゼの阻害のための、一般式(I)で表される化合物及び一般式(II)で表される化合物からなる群から選択される少なくとも1種の化合物の使用。

20



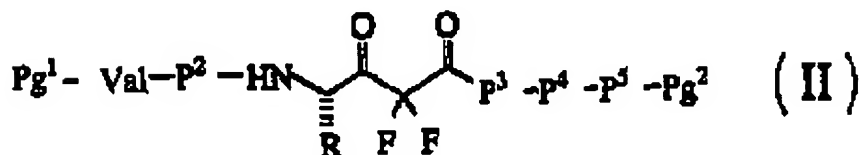
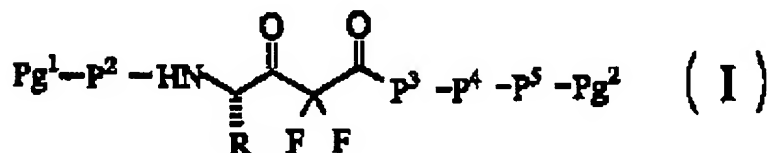
25



一般式 (I) 及び (II) 中、 $P^2$ は、L-イソロイシン残基、D-バリン残基又はL-バリン残基を、 $P^3$ は、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、 $P^4$ は、L-イソロイシン残基を、 $P^5$ は、直接結合、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、それぞれ表す。Rは、メチル基又はイソプロピル基を表す。 $Pg^1$ 及び $Pg^2$ は、それぞれ保護基を表す。

19. 一般式 (II) において、 $P^2$ はL-イソロイシン残基、 $P^3$ はL-バリン残基、 $P^4$ はL-イソロイシン残基、 $P^5$ は直接結合、Rはメチル基、 $Pg^1$ はt-ブトキシカルボニル基、 $Pg^2$ はメトキシ基である請求の範囲第18項記載の化合物の使用。

20. 関節滑膜細胞のNotch不活性化のための、一般式 (I) で表される化合物及び一般式 (II) で表される化合物からなる群から選択される少なくとも1種の化合物の使用。

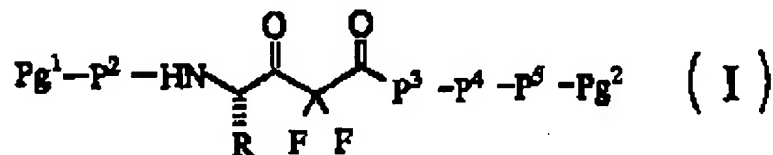


一般式 (I) 及び (II) 中、 $P^2$ は、L-イソロイシン残基、D-バリン残基又はL-バリン残基を、 $P^3$ は、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、 $P^4$ は、L-イソロイシン残基を、 $P^5$ は、直接結合、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、それぞれ表す。Rは、メチル基又はイソプロピル

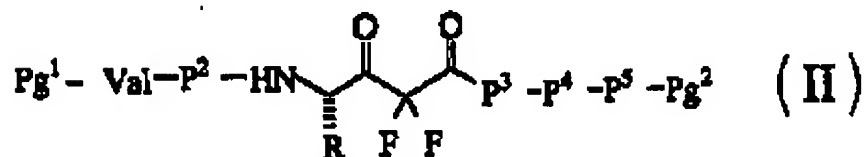
基を表す。Pg<sup>1</sup>及びPg<sup>2</sup>は、それぞれ保護基を表す。

21. 一般式 (I I) において、P<sup>2</sup>はL-イソロイシン残基、P<sup>3</sup>はL-バリン残基、P<sup>4</sup>はL-イソロイシン残基、P<sup>5</sup>は直接結合、Rはメチル基、Pg<sup>1</sup>は  
5 t-ブトキシカルボニル基、Pg<sup>2</sup>はメトキシ基である請求の範囲第20項記載の化合物の使用。

22. 慢性関節リウマチの治療のための、一般式 (I) で表される化合物及び一般式 (I I) で表される化合物からなる群から選択される少なくとも1種の化合物  
10 の使用。



15



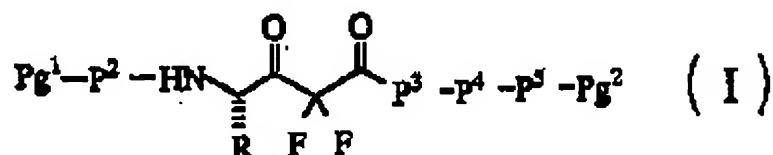
20

一般式 (I) 及び (I I) 中、P<sup>2</sup>は、L-イソロイシン残基、D-バリン残基又はL-バリン残基を、P<sup>3</sup>は、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、P<sup>4</sup>は、L-イソロイシン残基を、P<sup>5</sup>は、直接結合、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、それぞれ表す。Rは、メチル基又はイソプロピル  
25 基を表す。Pg<sup>1</sup>及びPg<sup>2</sup>は、それぞれ保護基を表す。

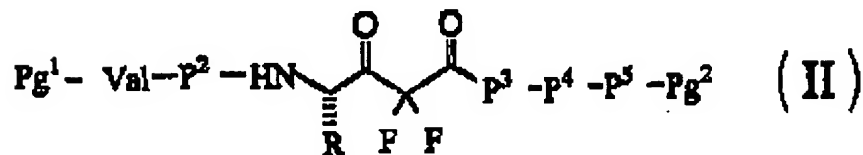
23. 一般式 (I I) において、P<sup>2</sup>はL-イソロイシン残基、P<sup>3</sup>はL-バリン残基、P<sup>4</sup>はL-イソロイシン残基、P<sup>5</sup>は直接結合、Rはメチル基、Pg<sup>1</sup>は  
t-ブトキシカルボニル基、Pg<sup>2</sup>はメトキシ基である請求の範囲第22項記載

の化合物の使用。

24. 関節滑膜細胞の増殖抑制のための、一般式 (I) で表される化合物及び一般式 (II) で表される化合物からなる群から選択される少なくとも1種の化合物の使用。



10



15

- 一般式 (I) 及び (II) 中、 $\text{P}^2$ は、L-イソロイシン残基、D-バリン残基又はL-バリン残基を、 $\text{P}^3$ は、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、 $\text{P}^4$ は、L-イソロイシン残基を、 $\text{P}^5$ は、直接結合、L-バリン残基又はL-フェニルアラニン残基を、それぞれ表す。Rは、メチル基又はイソプロピル基を表す。 $\text{Pg}^1$ 及び $\text{Pg}^2$ は、それぞれ保護基を表す。

20

25. 一般式 (II) において、 $\text{P}^2$ はL-イソロイシン残基、 $\text{P}^3$ はL-バリン残基、 $\text{P}^4$ はL-イソロイシン残基、 $\text{P}^5$ は直接結合、Rはメチル基、 $\text{Pg}^1$ はt-ブトキシカルボニル基、 $\text{Pg}^2$ はメトキシ基である請求の範囲第24項記載の化合物の使用。

25

1/2

图 1

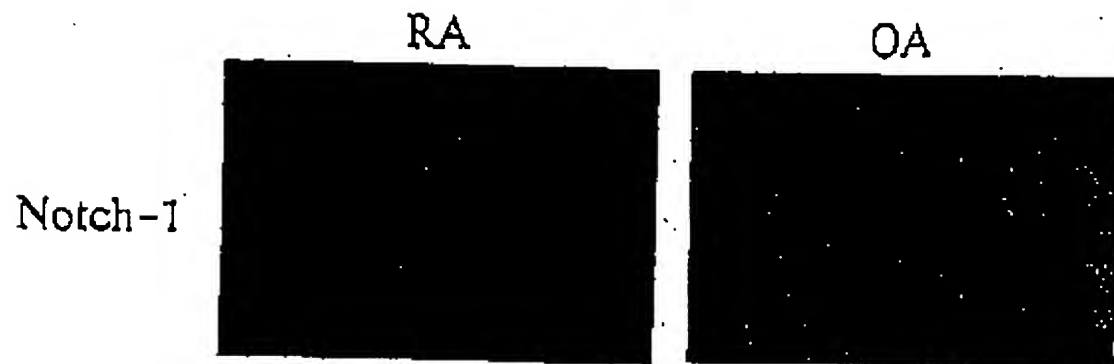
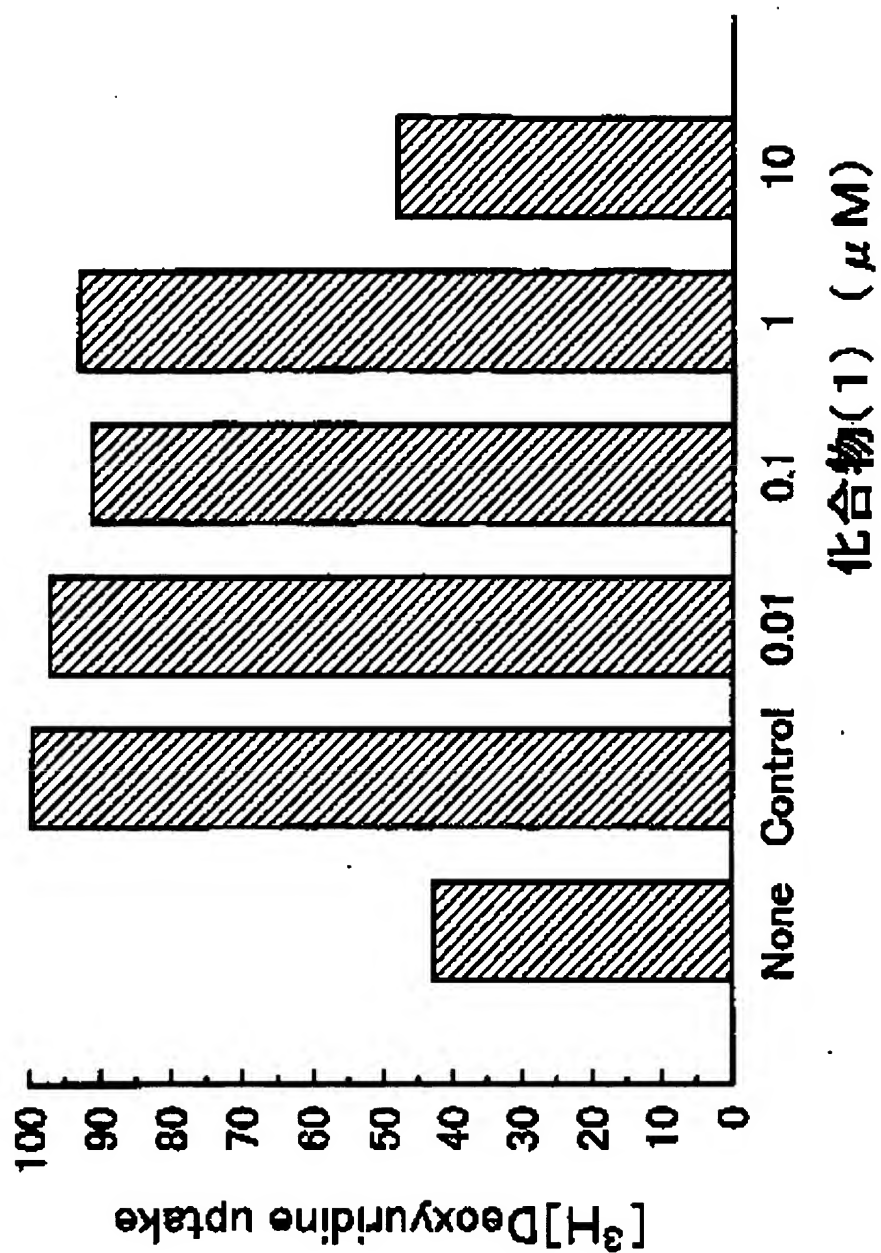


図 2



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02737

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.<sup>7</sup> A61K38/00, A61P29/00, 19/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.<sup>7</sup> A61K38/00, A61P29/00, 19/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BART De Strooper, et al., "A presenilin-1-dependent $\gamma$ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain", Nature (London), (1999), Vol.398, No.6727, pages 518 to 522	1-3
A		4-7
X	US, 5232928, A (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.), 03 August, 1993 (03.08.93) (Family: none)	6, 7
A		1-5
P, A	JP, 2001-122787, A (Gakko Hojin Sei Marianna Ika Daigaku), 08 May, 2001 (08.05.01) (Family: none) & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, OH, USA), AN.2001:328853	1-7
P, A	NAKAZAWA Minako, et al., "NF.kappa.B2 (p52) promoter activation via Notch signaling pathway in rheumatoid synoviocytes", Int. J. Mol. Med., (2001), Vol.7, No.1, pages 31 to 35	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
30 May, 2001 (30.05.01)Date of mailing of the international search report  
12 June, 2001 (12.06.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02737

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8-25  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Claims 8 to 25 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> A61K38/00, A61P29/00, 19/00, 43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> A61K38/00, A61P29/00, 19/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に利用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BMBASE (STN), BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	BART De Strooper, et al, 'A presenilin-1-dependent $\gamma$ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain.' Nature (London), 1999, Vol. 398, No. 6727, pages 518 to 522	1-3
A		4-7
X	US, 5232928, A (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.)	6, 7
A	3. 8月, 1993 (03. 08. 93) (No. family)	1-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 05. 01

国際調査報告の発送日

12.06.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区銀が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信



4C

9455

電話番号 03-3581-1101 内線 9451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	JP, 2001-122787, A (学校法人 聖マリアンナ医科大学) 8.5月.2001(08.05.01) (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), AN. 2001:328853	1-7
P, A	NAKAZAWA Minako, et al, 'NF.kappa.B2 (p52) promoter activa- tion via Notch signaling pathway in rheumatoid synovocytes. ' Int. J. Mol. Med., 2001, Vol.7, No.1, pages 31 to 35	1-7

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見(第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8-25 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲8乃至25は、治療による人体の処置方法に該当し、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見(第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。